

Deteksi bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada ikan - Bagian 1: Metode *polymerase chain reaction* (PCR)



© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Ruang lingkup.....	1
Istilah dan definisi	1
Peralatan	2
Bahan	2
Prosedur kerja	3
Pembacaan hasil	5
Lampiran A (Informatif) Contoh Pembuatan larutan	7
Bibliografi	9



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian laboratorium uji, maka perlu disusun suatu Rancangan Standar Nasional Indonesia (RSNI) tentang metode deteksi bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada ikan – bagian 1 : metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas pada rapat konsensus pada tanggal 23 - 25 Juni 2014 di Bogor, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 2 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. KEP. 26/MEN/2013 tentang penetapan jenis – jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa, dan sebarannya.

Standar ini telah dilakukan jajak pendapat pada tanggal 30 Agustus 2014 sampai dengan 29 Oktober 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada ikan – Bagian 1: Metode *polymerase chain reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi bakteri *Edwardsiella ictaluri* pada ikan dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan :

2.1

asam nukleat

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya. Asam nukleat yang dibawa oleh bakteri dapat berupa DNA (*deoksiribonukleat*) atau RNA (*ribonukleat*)

2.2

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.3

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.4

denaturasi

proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal

2.5

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik bakteri dari jaringan atau sel

2.6

ekstensi

proses sintesis DNA baru yang komplemen terhadap DNA target dengan bantuan enzim DNA polimerase

2.7

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.8

isolat bakteri

bakteri hasil pemurnian dari koloni yang terisolir

2.9

koktail

larutan yang berisi berbagai komponen untuk proses amplifikasi

2.10

pelet

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

2.11

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.12

template

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3 Prinsip umum

Mengisolasi DNA dari organ/jaringan yang diduga terinfeksi *E. ictaluri* dan atau dari kultur bakteri yang diduga *E. ictaluri*, dilanjutkan dengan amplifikasi secara *single step* menggunakan mesin PCR (*thermal cycler*).

4 Peralatan

- a) mesin PCR (*thermal cycler*);
- b) autoklaf;
- c) alat dokumentasi gel;
- d) alat elektroforesis gel agarose;
- e) *freezer* (-20°C);
- f) *magnetic stirrer*;
- g) mikropipet 10 µl – 1 000 µl;
- h) *microwave*;
- i) *mini mixer*;
- j) peralatan bedah;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) sentrifus minimal 12 000x g (12 000 rpm);
- m) timbangan analitik;
- n) transiluminator UV;
- o) *waterbath/heating block*.

5 Bahan

- a) akuabides;
- b) *agarose*;
- c) bufer TBE 0,5 x (*Tris Boric* EDTA; 45 mM *Tris Boric* dan 1 mM EDTA) atau TAE 1 x;
- d) *marker* DNA (100 bp DNA ladder);
- e) etanol absolut;
- f) isopropanol;
- g) 6 x *loading dye*;
- h) mikrotip;
- i) *nuclei lysis solution*;
- j) *protein precipitation solution*;
- k) *rehydration solution* (pelarut DNA);
- l) pewarna DNA;

- m) reagensia PCR:
- 5x bufer PCR;
 - MgCl_2 (25mM);
 - dNTPmix (10 mM);
 - *Taq* DNA polymerase (5 unit/ μl).
- n) Primer: gen 16S ribosomal RNA spesifik *Edwardsiella ictaluri* (Sanchez-Martinez *et. al*, 2012)
 Forward (5'-CGG ACG GGT GAG TAA TGT CT-3')
 Reverse (5'-TTA GCC GGT GCT TCT TCT GT-3')
- o) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml. .

6 Prosedur

6.1 Preparasi contoh uji

- masukkan 20 mg contoh uji organ target berupa jaringan hati atau seluruh bagian tubuh (larva) ke dalam tabung mikro yang telah berisi 600 μl bufer lisis.
- masukkan 1 koloni yang diduga bakteri *E. ictaluri* ke dalam tabung mikro yang telah berisi 600 μl bufer lisis.

6.2 Ekstraksi DNA organ target atau isolat¹

- inkubasikan pada 80 °C selama 5 menit.
- inkubasikan pada 27 °C - 28 °C.
- tambahkan 200 μl *protein precipitation solution*.
- homogenkan selama 30 detik.
- inkubasikan pada es selama 5 menit.
- sentrifugasi 13 000 rpm selama 2 menit.
- pindahkan supernatan ke dalam tabung mikro baru.
- tambahkan 600 μl isopropanol, diaduk secara perlahan, sentrifugasi pada 13 000 rpm selama 2 menit.
- uang supernatan, letakkan secara terbalik pada kertas tisu.
- tambahkan 600 μl etanol 70%, diaduk secara perlahan.
- sentrifugasi 13 000 rpm selama 2 menit kemudian buang supernatan.
- kering anginkan pelet dengan cara meletakkan tabung mikro secara terbalik pada kertas tisu selama 10 menit.
- tambahkan 100 μl *rehydration solution*, aduk secara perlahan.
- inkubasi pada 65 °C selama 1 jam.
- simpan DNA pada -20 °C.

6.3 Amplifikasi

- setiap analisa *E. ictaluri* dengan PCR harus ada kontrol *E. ictaluri* dan kontrol negatif atau *non template control*.
- siapkan reaksi PCR dengan memilih salah satu komposisi pada Tabel 1 atau Tabel 2:

¹ prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan kompatibel dengan bahan amplifikasi yang sudah divalidasi

Tabel 1 Komposisi bahan koktail PCR

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	14,875	-
bufer PCR 5 x	5,0	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTPmix (10 mM)	0,5	200 µM
primer F (10 µM)	0,5	0,2 µM
primer R (10 µM)	0,5	0,2 µM
Taq DNA polymerase (5 U/ µl)	0,125	0,025 U
DNA template	2,00	0,8 ng - 8 ng
Total	25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

Tabel 2 Komposisi bahan koktail PCR dengan *mastermix* komersial

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
akuabides	9,5	-
<i>mastermix</i> 2 x	12,5	1 x
primer F (10 µM)	0,5	0,2 µM
primer R (10 µM)	0,5	0,2 µM
DNA template	2	0,8 ng - 8 ng
Total	25	
CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi		

- c) setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, bagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl.
- d) tambahkan *template* atau contoh uji DNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (ddH₂O), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl.
- e) homogenkan dan masukkan tabung mikro ke dalam mesin PCR (*thermocycler*).
- f) atur profil amplifikasi seperti Tabel 3.

Tabel 3 Profil amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	95	5 menit	-
Denaturasi	94	30 detik	30
<i>Annealing</i>	62	30 detik	
Ekstensi	72	60 detik	
Ekstensi akhir	72	10 menit	-
<i>Hold</i>	4	sampai proses berikutnya	-
CATATAN Komposisi reaksi dan prosedur amplifikasi PCR disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan			

- g) setelah proses berakhir, matikan *thermocycler* dan keluarkan tabung mikro.
- h) produk PCR siap dijalankan di elektrophoresis.

6.4 Elektroforesis

6.4.1 Persiapan

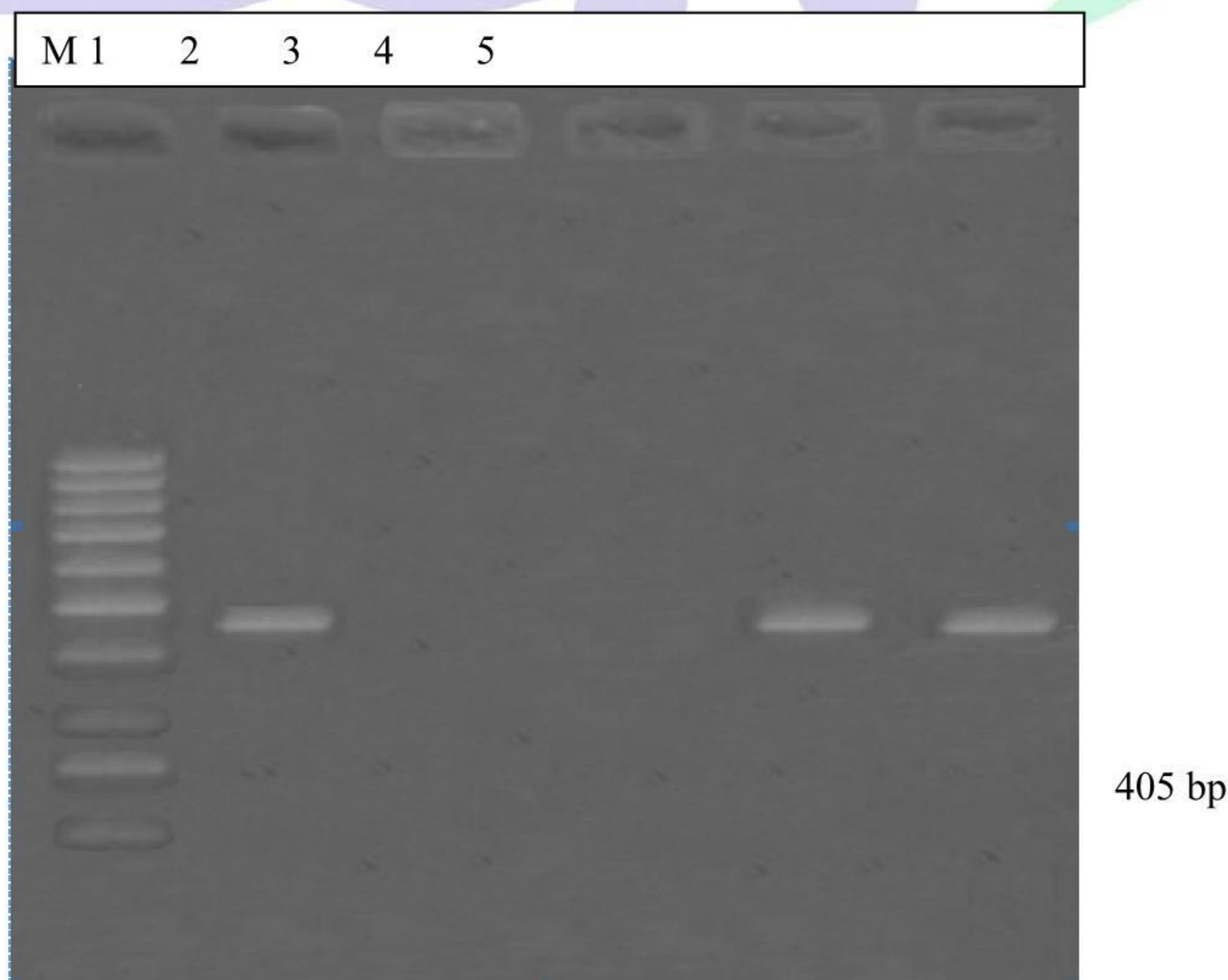
Contoh pembuatan bufer elektroforesis dan gel dapat dilihat pada Lampiran A.

6.4.2 Prosedur

- letakkan 1,5% gel agarose ke elektroforesis *chamber*.
- tambahkan larutan TBE 0,5 x ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel agarose terendam.
- siapkan 2 μ l *loading buffer* di atas parafilm sesuai jumlah contoh dan 1 marker.
- ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 μ l dan campur dengan *loading buffer*.
- masukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan mikropipet disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 μ l.
- masukkan contoh uji ke masing-masing sumuran kemudian pasang tutup elektroforesis *chamber* dan alirkan arus listrik dengan voltase 100 V -150 V.
- hentikan elektroforesis setelah pewarna biru-bromofenol mencapai 2/3 bagian panjang gel agarose.

7 Pengamatan hasil dan dokumentasi

- setelah selesai proses elektroforesis, gel diangkat dari *chamber*;
- rendam gel dalam larutan zat pewarna DNA 0,05% selama 10 menit. Gunakan sarung tangan;
- rendam gel dengan akuades/ air mengalir selama 10 menit;
- amati dengan transiluminator UV dan dokumentasikan.



Keterangan :

- M : Marker (100 bp DNA Ladder)
- 1 : Kontrol positif *Edwardsiella ictaluri* (405 bp)
- 2 : SDW (kontrol negatif)
- 3 : contoh uji bakteri lain (kontrol negatif)
- 4 : contoh uji positif *E. ictaluri* (405 bp)
- 5 : contoh uji positif *E. ictaluri* (405 bp)

Gambar 1 - Hasil deteksi *Edwardsiella ictaluri* dengan metode PCR

8 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel agarose setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR menggunakan pasangan primer F dan R yang diamati dengan transiluminator UV, maka:

- kontrol negatif (blangko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 405 bp.
- kontrol DNA negatif (DNA selain *E. ictaluri*): tidak terlihat adanya pita berukuran 405 bp.
- kontrol positif : terlihat adanya pita berukuran 405 bp.
- contoh uji negatif *E. ictaluri*: tidak terlihat adanya pita berukuran 405 bp.
- contoh uji positif *E. ictaluri*: terlihat adanya pita berukuran 405 bp.

9 Jaminan mutu

- a) hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio $\text{A}_{260} / \text{A}_{280}$ berkisar 1,8 – 2,0.
- b) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan 2 kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A
(informatif)
Contoh pembuatan larutan

A.1 Larutan Tris-HCl 0,5 M

Cara membuat :

- a) larutkan 121,1 g *Tris base* dalam 800 ml akuades;
- b) tambahkan 70 ml atau 42 ml HCl pekat untuk mendapatkan pH 7,4 atau 8,0;
- c) biarkan larutan dingin pada 25 °C – 30 °C sebelum pengaturan pH terakhir;
- d) tambahkan akuades hingga 1 l;
- e) alikuot dalam beberapa botol;
- f) sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.2 Larutan Proteinase K 10 mg/ml

Cara membuat:

- a) larutkan 100 mg proteinase K ke dalam larutan steril yang mengandung 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) dan 5 mM CaCl_2 hingga volumenya 10 ml (campur 8 880 μl akuades, 1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 7,4 dan 20 μl 2,5 M CaCl_2);
- b) alikuot 1 ml dan simpan pada -20 °C.

A.3 Larutan *disodium ethylene diamine tetra acetate* (Na-EDTA) 0,5 M (pH 8)

Cara membuat:

- a) tambahkan 186,1 g Na-EDTA.2H₂O dalam 800 ml akuades.
- b) homogenkan dengan *magnetic stirrer*.
- c) tambahkan NaOH secara bertahap sambil dihomogenkan (± 20 g NaOH pelet) hingga mencapai pH 8.
- d) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.4 Larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10 %

Cara membuat :

- a) larutkan 100 g SDS *electrophoresis grade* ke dalam 900 ml akuades.
- b) panaskan pada 68 °C untuk melarutkan SDS.
- c) tambahkan beberapa tetes HCl pekat hingga mencapai pH 7,2.
- d) tambahkan akuades hingga 1 liter dan masukkan ke dalam botol reagen.
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.5 Larutan pewarna DNA 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Cara membuat :

- a) tambahkan 5 μl larutan pewarna DNA 10 mg/ml ke dalam 100 ml bufer TBE.
- b) simpan di tempat yang gelap agar larutan pewarna DNA lebih awet.

A.6 Larutan CH_3COONa 3 M (pH 5,2)

Cara membuat :

- a) larutkan 408,1 g sodium asetat 3 H₂O dalam 800 ml akuades.

- b) tambahkan asam asetat glasial hingga mencapai pH 5,2.
- c) tambahkan akuades sampai 1 l.
- d) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada 121 °C.

A.7 Bufer TBE 5x

Cara membuat:

- a) masukkan 800 ml akuades ke dalam beaker berkapasitas 1 l.
- b) masukkan 54 g *Tris base* dan 27,5 g asam borat ke dalam *beaker glass* yang telah berisi akuades dan aduk dengan *magnetic stirrer* sampai terlarut.
- c) tambahkan 20 ml EDTA 0,5 M, homogenkan.
- d) tambahkan akuades sampai 1 l.
- e) alikuot dan sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C

A.8 Gel Agarose 1,5%

Cara membuat :

- a) larutkan 1,5 g *agarose* dalam 100 ml bufer TBE 0,5 x
- b) didihkan hingga larutan menjadi bening.
- c) tuang *gel agarose* pada cetakan dengan sisir terpasang, setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C.

A.9 Bufer lisis

Cara membuat :

- a) campurkan 69,7 ml akuades; 10 ml Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0); 200 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0); 10 ml NaCl 5 M; dan 10 ml SDS 10%.
- b) tambahkan 100 µl Proteinase K 10 mg/ml sesaat sebelum digunakan, untuk mendapatkan larutan dengan kadar akhir Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM, NaCl 500 mM, SDS 1%, dan *Proteinase K* 10 µg/ml.

Bibliografi

- OIE (Office des Internationale Epizootics) 2012. *Manual Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Fifth Edition, chapter 2.1.12.*
- Sanchez-Martinez J.G., R. Perez-Castaneda, V.Sauceda, J. Rabago Castro and G.A.Guzman. 2012. Rapid detection of *Edwardsiella ictaluri* from Channel Catfish Tissue and Water Samples by PCR Amplification. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(20): 3823-3826
- Williams , M.L., Waldbiever, G.C., Dyer, D.W., Gillaspy, A.F. and Lawrence, M.L. 2008. Characterization of the *rn* operons in the *Channel Catfish* Pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Applied Microbiology*, 104 : 1790 – 1796. Doi : 10.1111/j.1365 – 2672. 03704.x.

